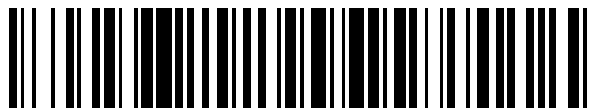


19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 450 840**

21 Número de solicitud: 201350007

51 Int. Cl.:

**G01N 33/58**

(2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**19.04.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.03.2014**88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el  
estado de la técnica:**03.04.2014**

Fecha de la concesión:

**15.10.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**22.10.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)  
Campus Universitario, s/n  
36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**Liz Marzán, Luis Manuel;  
Álvarez Puebla, Ramón Ángel;  
García De Abajo, Francisco Javier y  
García-rico Fernández, Eduardo**54 Título: **Partículas codificadas**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una partícula codificada. Específicamente, la partícula codificada según la presente invención, comprende:

- a) al menos un núcleo metálico;
  - b) un agente de marcaje unido a la superficie de dicho núcleo metálico, proporcionando un núcleo metálico marcado;
  - c) una capa externa de un material inerte que encapsula a dicho núcleo metálico marcado; y
  - d) al menos una biomolécula directamente o indirectamente unida a dicha capa externa.
- Además, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una partícula codificada. Además, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una microesfera y a la microesfera obtenida por el método.

Además, la presente invención se refiere a un método para detectar materiales biológicos. Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de una partícula codificada.

ES 2 450 840 B1

## DESCRIPCIÓN

Partículas codificadas.

La presente invención se refiere a una partícula codificada. Además, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una partícula codificada. Además, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una microesfera y a la microesfera obtenida por el método. Además, la presente invención se refiere a un método para detectar materiales biológicos. Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de una partícula codificada.

Las estrategias ideales para el descubrimiento de fármacos así como para el análisis de cualquier material biológico deberían permitir a los usuarios investigar simultáneamente la presencia de un gran número de marcadores biológicos en cada muestra (p.e. muestreo de alto rendimiento) y extraer una conclusión rápida y precisa sobre la actividad de un grupo de sustancias. En este momento, muchas de estas estrategias incluyen típicamente el barrido de librerías químicas para compuestos de interés y la identificación de moléculas diana específicas, tales como antígenos, anticuerpos, nucleótidos y péptidos. Herramientas prometedoras para este propósito son las 'tecnologías multiplex', las cuales permiten llevar a cabo múltiples ensayos discretos simultáneamente en la misma muestra. Quizás uno de los retos más importantes para el desarrollo de ensayos multiplex es la necesidad de seguir cada reacción. Por ejemplo, si solo sucede una reacción de interés en un grupo de miles de moléculas que se muestrean frente a un cierto analito-diana, debe ser posible determinar cuál molécula era responsable de esa reacción particular. US 2011/0046009 A1 describe un método para detectar el estado de metilación de un locus genómico diana. En el método de US 2011/0046009 A1, la señal codificada se basa solamente en detección por fluorescencia a través de conjuntos de partículas codificadas.

Por lo tanto, hay una necesidad continua en el anterior estado del arte de proporcionar una partícula codificada que sea detectable mediante un amplio rango de técnicas de detección, y/o cuya presencia pueda ser detectada fácilmente y/o localizada, y/o cuya composición pueda ser fácilmente analizada. Además, hay una continua necesidad en el anterior estado del arte de proporcionar un método para preparar una partícula codificada. Además, hay una continua necesidad de proporcionar un método de detección mejorado para un material biológico determinado.

La presente invención tiene como objetivo, entre otros objetivos, proporcionar una partícula codificada que presenta las ventajas arriba indicadas. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una partícula codificada que permita la unión de material biológico, y de esta forma proporcionar el marcaje del material biológico con la partícula codificada. Esto se consigue por la presente invención por la partícula codificada que comprende:

- a) al menos un núcleo metálico;
- b) un agente de marcaje unido a la superficie de dicho núcleo metálico, proporcionando un núcleo metálico marcado;
- c) una capa externa de un material inerte que encapsula dicho núcleo metálico marcado; y
- d) al menos una biomolécula directamente o indirectamente unida a dicha capa externa.

En el contexto de la presente invención, el núcleo metálico en la partícula codificada comprende al menos un núcleo metálico, que puede ser un núcleo metálico, dos núcleos metálicos, tres núcleos metálicos, cuatro núcleos metálicos o más. La partícula codificada de la presente invención puede contener por tanto al menos dos núcleos metálicos. El término "núcleo" se entiende como la parte interna de la partícula codificada.

El al menos un núcleo metálico en la partícula codificada de la presente invención puede estar hecho de un metal, o una combinación de metales, de la tabla periódica. Los metales preferidos pueden ser hierro, cobalto, níquel, paladio, platino, cobre, plata, oro. Ventajosamente, están hechos de plata u oro. Ventajosamente, el al menos un núcleo metálico está hecho de una aleación de plata y/u oro.

El al menos un núcleo metálico puede presentar en la superficie del núcleo, moléculas de surfactante que estabilizan el núcleo metálico. Algún surfactante o polímero puede estar sustancialmente presente en la superficie del núcleo metálico. El surfactante puede ser cualquier complejo aromático o alifático de amonio, ácido carboxílico o polimérico que estabiliza el núcleo metálico. Ejemplos de surfactantes son el bromuro de cetil trimetil amonio, citrato, ácido oleico, poli(vinilpirrolidona), ácido poliacrílico.

El agente de marcaje también se puede designar como molécula que comprende un código, o código molecular, o código de barras. El agente de marcaje se une, o retiene, a la superficie de dicho núcleo metálico. Se debe entender

que el agente de marcaje está situado en torno al núcleo metálico. El agente de marcaje, en el contexto de la presente invención está proporcionado por la retención de una molécula que comprende un sistema conjugado, como al menos un grupo aromático. Ejemplos de agentes de marcaje adecuados incluyen un anillo fenilo o naftaleno. Un anillo fenilo, comúnmente designado como grupo fenilo comprende 6 átomos de carbono  $sp^2$ . Un anillo naftaleno comprende 10 átomos de carbono  $sp^2$ . El grupo aromático puede estar sustituido con cualquier grupo orgánico. Preferentemente, en el contexto de la presente invención, el anillo aromático está sustituido con un grupo funcional escogido entre: -SH, -SeH, TeH, aminas (primarias, secundarias, terciarias), cianuros, -S-, -Se-, -Te-, o cualquier otro grupo que permita la fijación sobre un núcleo metálico, por auto-ensamblaje y/o interacciones electrostáticas. Ejemplos de agentes de marcaje, en el contexto de la presente invención, incluyen colorantes, tioles aromáticos, selenuros aromáticos, telururos aromáticos, aminas aromáticas, cianuros aromáticos o cualquier otra molécula conjugada que contenga al menos un grupo que presente alta afinidad por superficies de plata y/u oro.

El agente de marcaje está unido a la superficie del mencionado núcleo metálico, proporcionando un núcleo metálico marcado. El núcleo metálico sobre cuya superficie se une el agente de marcaje, se designa también como núcleo metálico marcado.

El núcleo metálico marcado se encapsula a su vez por la capa externa de material inerte. El material es un material inerte, y el término "inerte" se debe entender como que no interacciona con el agente de marcaje.

La capa externa se localiza por tanto sobre la superficie de la partícula marcada, en torno al agente de marcaje. La capa externa que encapsula el núcleo metálico marcado puede ser regular o irregular en grosor.

Por lo tanto, la partícula codificada de la presente invención está compuesta de una parte interna hecha de al menos un núcleo metálico, alrededor del cual se une un agente de marcaje, también designado como fijado, o retenido, o adsorbido, y subsiguientemente, sigue la capa externa encapsulante. El agente de marcaje puede estar unido alrededor del núcleo metálico por enlaces covalentes, o por fuerzas electrostáticas y/o de van der Waals.

La capa externa de material inerte también se puede designar como capa protectora y puede contener recubrimientos producidos por óxidos inorgánicos o polímeros. Los óxidos inorgánicos son cualesquiera óxidos inorgánicos adecuados. Ejemplos de óxidos inorgánicos son sílice ( $SiO_2$ ) o titanía ( $TiO_2$ ). Polímeros pueden ser cualquier polímero adecuado. Ejemplos son copolímeros de polietilén glicol u homopolímeros de polietilén glicol, o copolímeros de bloques con biocompatibilidad adecuada y grupos funcionales reactivos, o proteínas.

Ventajosamente, la capa externa puede estar hecha de al menos una capa molecular de un siloxano o un titanoxano que se une al agente de marcaje con un grupo funcional adecuado. El siloxano o titanoxano proporciona una capa externa de sílice o titanía sobre la superficie de la partícula codificada. La superficie de la capa externa está dotada de un grupo funcional. El siloxano puede tener la fórmula general  $X-R^1-Si(OR^2)(OR^3)(OR^4)$ , donde X es el grupo funcional,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son un hidrógeno o un grupo alquilo de cualquier longitud, pueden ser los mismos o diferentes. Cualquiera de los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  pueden estar ausentes. El titanoxano puede tener la fórmula general  $X-R^1-Ti(OR^2)(OR^3)(OR^4)$ , donde X es el grupo funcional,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son un hidrógeno o un grupo alquilo de cualquier longitud, pueden ser los mismos o diferentes. Cualquiera de los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  pueden estar ausentes. Los siloxanos y titanoxanos usados como capa externa en la presente invención también pueden contener algún siloxano o titanoxano que contenga cadenas ramificadas o no ramificadas de átomos de silicio y oxígeno alternados -Si-O-Si-O- o -Ti-O-Ti-O, con grupos alquilo unidos a los átomos de silicio o titanio. Los siloxanos y titanoxanos que contengan al menos un grupo alquilo también se pueden designar como alkoxisilanos o alkoxititanos.

El grupo funcional, X, del siloxano o el titanoxano puede ser cualquier grupo funcional orgánico. Ventajosamente, se han obtenido Buenos resultados con grupos funcionales escogidos del grupo: -SH, -SeH, TeH, aminas (primarias, secundarias, terciarias), cianuro, tiocianuro, -S-, -Se-, -Te-, -COOH, -COO-, F-, Cl-, Br-.

En el contexto de la presente invención, "al menos un grupo funcional" se debe entender como al menos un tipo de grupo funcional. La superficie de la capa externa puede poseer un tipo, dos tipos o tres tipos de grupos funcionales.

La partícula codificada según la presente invención comprende al menos una biomolécula directamente o indirectamente unida a la superficie de la capa externa. Si la biomolécula está unida directamente a la capa externa de material inerte, la al menos una biomolécula puede estar unida covalentemente a la capa externa, o unida electrostáticamente y/o por fuerzas de van der Waals. Las biomoléculas pueden ser aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, péptidos, sacáridos, hormonas, lípidos u otras macromoléculas adecuadas para interacciones.

Si la al menos una biomolécula está unida covalentemente (o enlazada covalentemente) a la capa externa, la al menos una biomolécula puede estar unida a través de un punto de enlace. El punto de enlace puede ser el mismo o diferente que el siloxano o titanoxano descrito más arriba. Por lo tanto, en la capa externa de material inerte, puede

estar adicionalmente presente un punto de enlace. El punto de enlace, o punto de enlace químico, está funcionalizado por al menos un grupo funcional, como pueden ser tioles (-SH), selenoles (-SeH), telurales (TeH), aminas (primarias, secundarias, terciarias), cianuros (-CN), tiocianuros (-SCN), sulfuros (-S-), seleniuros (-Se-), telururos (-Te-), grupos carboxilo (-COOH), ésteres (-COO-). Estos grupos funcionales pueden permitir la unión con otras moléculas, como biomoléculas.

Según la presente invención, el núcleo metálico de la partícula codificada es esférico, o elipsoidal o cónico, o cilíndrico, o cúbico, o cuboide, o piramidal de base cuadrada, o piramidal de base triangular, o triangular prismático, u octagonal prismático.

Una forma esférica se debe entender como un objeto geométrico perfectamente redondo en el espacio tridimensional, o sustancialmente imperfecto. Aquí "esférico" se debe entender como perfectamente esférico o sustancialmente esférico. En el contexto de la presente invención, las formas citadas pueden ser formas perfectas o pueden presentar algunas imperfecciones geométricas, dando geometrías sustancialmente imprecisas. Una forma elipsoidal se debe entender como un análogo de dimensional superior de una elipse. Una forma cónica se debe entender como una forma geométrica que se afila suavemente desde una base plana, normalmente circular hasta un punto llamado *vértice*. De forma más precisa, es la figura sólida rodeada por una base plana y la superficie (llamada *superficie lateral*) formada por el locus de todos los segmentos lineales rectos que unen el vértice con el perímetro de la base. Una forma cilíndrica se debe entender como una forma geométrica curvilínea, cuya superficie está formada por los puntos a una distancia fija de un segmento dado, el eje del cilindro. El sólido encerrado por esta superficie y por dos planos perpendiculares al eje también se llama cilindro. Una forma cúbica se debe entender como un sólido tridimensional rodeado por seis caras, facetas o lados cuadrados, de forma que tres se encuentran en cada vértice. La forma cúbica también se puede llamar hexaedro regular. Es una forma especial de prisma cuadrado, de paralelepípedo rectangular y de trapezoedro trigonal. Una forma cuboica se debe entender como una forma con seis lados, que forman un poliedro convexo. Existen dos definiciones de un cuboide que compiten (pero son incompatibles) en la bibliografía matemática. En la definición más general de un cuboide, el único requisito adicional es que cada una de estas seis caras sea un cuadrilátero, y que el gráfico no dirigido formado por los vértices y los lados del poliedro debe ser isomórfico con el gráfico de un cubo. Alternativamente, la palabra "cuboide" se puede usar para referirse a una forma de este tipo en la cual cada una de las caras es un rectángulo (y por tanto cada par de caras adyacentes se encuentran en un ángulo recto); este tipo más restrictivo de cuboide también se conoce como cuboide recto, caja rectangular, hexaedro rectangular, prisma rectangular recto, o paralelepípedo rectangular. Una forma piramidal de base cuadrada o piramidal de base triangular se deben entender como una pirámide cuadrada o una pirámide triangular, respectivamente. En una pirámide que tiene una base cuadrada, si el vértice está perpendicularmente encima del centro del cuadrado, tendrá la simetría  $C_{4v}$ . En una pirámide que tenga una base triangular, si el vértice está perpendicularmente encima del centro del triángulo, tendrá la simetría  $C_{3v}$ . La forma del núcleo metálico puede ser prismática triangular. Un prisma triangular es un prisma de tres lados; es un poliedro hecho de una base triangular, una copia trasladada, y 3 caras que unen lados correspondientes. Equivalentemente, es un pentaedro del cual dos caras son paralelas, mientras que las normales a la superficie de las otras tres están en el mismo plano (que no es necesariamente paralelo a los planos base). Estas tres caras son paralelogramos. Todos los cortes paralelos a las caras base son el mismo triángulo. Una forma prismática octagonal es la sexta en un conjunto infinito de prismas, formada por lados cuadrados y dos tapas que son octágonos regulares. Si las caras son todas regulares, es un poliedro semiregular. En el contexto de la presente invención, si la forma del al menos un núcleo metálico es prismática octagonal, también se puede designar como varilla.

Según la presente invención, el al menos un núcleo metálico de la partícula codificada tiene una superficie dotada de al menos una punta. Al menos una punta se debe entender como una punta, dos puntas, tres puntas, cuatro puntas, cinco puntas, seis puntas, siete puntas, ocho puntas, nueve puntas, diez puntas, sin limitación en cuanto al número máximo de puntas. Por lo tanto, la superficie puede estar dotada de múltiples puntas. El núcleo metálico puede tener cualquiera de las formas recitadas arriba y además estar dotado de al menos una punta. El núcleo metálico con una superficie dotada de al menos una punta, cuando comprende al menos tres puntas, también se puede designar como una estrella, o núcleo con forma de estrella. Un núcleo con forma de estrella también se puede designar como una partícula con forma de estrella (PFE). Ventajosamente, el al menos un núcleo metálico es un núcleo con forma de estrella. La forma de estrella puede ser regular geoméricamente (al menos dos puntas de aproximadamente el mismo tamaño y grosor) o irregular (al menos dos puntas de tamaños y grosores diferentes). La ventaja de que el al menos un núcleo metálico sea una partícula en forma de estrella (PFE) es que la presencia de puntas mejora las propiedades del núcleo metálico. La presente invención sorprendentemente muestra que cuando los núcleos metálicos tienen forma de estrella mejora las propiedades del núcleo metálico. Además, un núcleo con forma de estrella permite una mejor detección del agente de marcaje. Por ejemplo, la detección del agente de marcaje puede llevarse a cabo por espectroscopia de dispersión Raman aumentada en superficies (SERS), que presenta la ventaja de que la detección se puede llevar a cabo bajo un microscopio óptico convencional unido a un espectrómetro Raman. Por lo tanto, equipos sencillos pueden permitir la detección de las partículas codificadas. Para detección por SERS, las partículas codificadas se pueden fijar sobre una superficie bien por ensamblaje electrostático capa-por-capo con los polímeros apropiados o por auto-ensamblaje directo sobre la superficie, previamente funcionalizada

con tioles aromáticos, seleniuros, telururos, aminas, cianuros u otros grupos que muestren alta afinidad por superficies de plata y/u oro.

5 Para algunas aplicaciones, la posibilidad de observar y resolver partículas individuales puede ser necesaria. Dado que los sistemas micro-Raman convencionales unidos a microscopios confocales poseen una resolución espacial de unos 500 nm, estas aplicaciones requieren partículas codificadas de mayor tamaño, normalmente en las escalas submicrométrica, o incluso micrométrica. Según la presente invención, partículas codificadas con un núcleo con forma de estrella proporcionan mejor detección y una señal aumentada.

10 Según la presente invención, la al menos una biomolécula unida a la capa externa se escoge de entre el grupo aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, hormonas, lípidos.

15 Los aminoácidos son moléculas que comprenden un grupo amino, un grupo ácido carboxílico y una cadena lateral que varía entre diferentes aminoácidos. Los elementos clave de un aminoácido son carbono, hidrógeno, oxígeno, y nitrógeno. Son particularmente importantes en bioquímica, donde el término normalmente se refiere a *alfa-aminoácidos*. Un alfa-aminoácido tiene la fórmula genérica  $H_2NCHYCOOH$ , donde Y es un sustituyente orgánico, el grupo amino está unido al átomo de carbono inmediatamente adyacente al grupo carboxilato (el carbono  $\alpha$ ). Otros tipos de aminoácido existen cuando el grupo amino está unido a un átomo de carbono diferente; por ejemplo, en gamma-aminoácidos (como el gamma-aminoácido-butírico) el átomo de carbono al que se une el grupo amino está separado del grupo carboxilato por otros dos átomos de carbono. Los diversos alfa-aminoácidos difieren en cuál cadena lateral (o grupo Y) está unido a su carbono alfa, y puede variar en tamaño desde solo un átomo de hidrógeno en la glicina hasta un grupo heterocíclico grande en el triptófano.

25 Los péptidos son polímeros cortos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Poseen los mismos enlaces peptídicos que los de las proteínas, pero suelen ser más cortos en longitud. Los péptidos más cortos son los dipéptidos, que consisten en dos aminoácidos unidos por un único enlace peptídico. También puede haber tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, etc. Los péptidos tienen un extremo amino y un extremo carboxilo, a no ser que sean péptidos cíclicos. Un polipéptido es una cadena lineal sencilla de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Las moléculas de proteínas consisten en uno o más polipéptidos puestos juntos típicamente de una forma biológicamente funcional y a veces lleva unidos grupos no-peptídicos, que se pueden llamar grupos prostéticos o cofactores.

35 Las proteínas son compuestos bioquímicos que consisten en uno o más polipéptidos típicamente doblados en una forma globular o fibrosa de una forma biológicamente funcional. Un polipéptido es una única cadena polimérica lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos aminoácidos adyacentes. La secuencia de aminoácidos en una proteína está definida por la secuencia de un gen, que está codificado en el código genético. En general, el código genético especifica 20 aminoácidos estándar; sin embargo, en ciertos organismos el código genético puede incluir selenocisteína - y en ciertos archaea-pirrolisina. Poco después o incluso durante la síntesis, los residuos de una proteína suelen estar modificados químicamente por modificación post-translacional, la cual altera las propiedades físicas y químicas, plegado, estabilidad, actividad, y en última instancia, la función de las proteínas. A veces las proteínas tienen grupos no-peptídicos unidos, que se pueden llamar grupos prostéticos o cofactores. Las proteínas también pueden trabajar juntas para conseguir una función particular, y suelen asociarse para formar complejos estables.

45 Los carbohidratos son compuestos orgánicos con la fórmula empírica  $C_m(H_2O)_n$ ; es decir, solo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, con una relación hidrógeno:oxígeno de 2:1 (como en el agua). Los carbohidratos se pueden ver como hidratos de carbono, de ahí su nombre. Estructuralmente sin embargo, es más preciso verlos como polihidroxialdehídos y cetonas.

50 Los carbohidratos también se pueden designar como sacáridos. Los carbohidratos (sacáridos) se dividen en cuatro grupos químicos: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos. En general, los monosacáridos y disacáridos, que son carbohidratos más pequeños (peso molecular más bajo), suelen conocerse como azúcares.

55 Las hormonas son liberadas químicamente por una célula o una glándula en una parte del cuerpo que envía mensajes que afectan a células en otras partes del organismo. Solo se necesita una pequeña cantidad de hormona para alterar el metabolismo celular. En esencia, es un mensajero químico que transporta una señal de una célula a otra. Todos los organismos multicelulares producen hormonas; las hormonas de las plantas también se denominan fitohormonas. Las hormonas en animales suelen transportarse en la sangre. Las células responden a una hormona cuando expresan un receptor específico para esa hormona. La hormona se une a la proteína receptora, dando como resultado la activación de un mecanismo de transducción de señal que en última instancia conduce a respuestas específicas del tipo de célula.

Los lípidos son un grupo amplio de compuestos que incluye las grasas, ceras, esteroides, vitaminas solubles en grasa (como las vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos, y otros. Las principales funciones biológicas de los lípidos incluyen el almacenamiento de energía, como componentes estructurales de membranas celulares, y como importantes moléculas señaladoras.

Los lípidos se pueden definir en general como moléculas pequeñas hidrofóbicas o anfifílicas; la naturaleza anfífila de algunos lípidos les permite formar estructuras como vesículas, liposomas, o membranas en un entorno acuoso. Los lípidos biológicos se originan por completo o en parte de dos tipos distintos de subunidades bioquímicas o "bloques constructores": grupos cetoácido e isopreno. Usando esta aproximación, los lípidos se pueden dividir en ocho categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos (derivados de la condensación de subunidades cetoácido); y lípidos esteroles y prenol (derivados de la condensación de subunidades isopreno). Los lípidos también incluyen moléculas como ácidos grasos y sus derivados (que incluyen tri-, di-, y monoglicéridos y fosfolípidos), así como otros metabolitos que contienen esteroles como el colesterol.

Según la presente invención, la al menos una biomolécula está directamente unida a la capa externa del material inerte. Por directamente unido, se debe entender unido por cualquier interacción adecuada para la unión de la al menos una biomolécula. La al menos una biomolécula puede unirse ventajosamente a la capa externa de material inerte por medio de interacciones covalentes, electrostáticas, o de van der Waals.

Según la presente invención, la al menos una biomolécula se une por un enlazador que comprende al menos un grupo funcional escogido del grupo -OH, -SH, -SeH, -TeH, -COOH, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria. El enlazador es ventajosamente un siloxano o un titanoxano, pero también puede ser un alcano funcionalizado que no interfiere con el agente de marcaje.

Según la presente invención, la al menos una biomolécula unida indirectamente a la capa externa está unida covalentemente a la capa externa, por (o a través) de una capa de material inerte que comprende la partícula marcada en su interior. Por lo tanto, en esta realización de la presente invención, el núcleo metálico marcado está incrustado en una capa (que también se puede designar como primera capa) de material inerte y luego encapsulado por la capa externa de material inerte. La mencionada (primera) capa puede o no ser del mismo material inerte que la capa externa y por tanto puede ser de cualquier óxido inorgánico o polímero definido en el contexto de la presente invención. Según la presente invención, el material inerte es un óxido inorgánico o un polímero orgánico que comprende al menos un grupo escogido de -OH, -SH, -SeH, -TeH, -COOH, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, ácido bórico, haluros. Ventajosamente, el al menos un grupo está situado en la superficie de la capa externa. El grupo -OH se designa como grupo hidroxilo, -SH como tiol, -SeH como selenol, -TeH como telurol, -COOH como carboxílico, amina primaria es -NH<sub>2</sub>, amina secundaria es -NH- y tiene dos restos alquilo, una amina terciaria es una amina con tres restos alquilo. El ácido bórico es -B(OH)<sub>2</sub> y en el contexto de la presente invención, los haluros son F-, Cl- o Br-.

En la presente invención, la partícula codificada comprende ventajosamente una capa externa hecha de un material inerte escogido del grupo siloxano, titanoxano, polímeros de polietilén-glicol, polímeros de polivinil-alcohol.

Siloxanos y titanoxanos son polímeros, que alternan átomos de silicio, o titanio respectivamente, y oxígeno, donde el silicio está opcionalmente sustituido con un átomo de hidrógeno o una cadena alquílica. Un siloxano es cualquier compuesto químico compuesto de unidades de la forma R<sub>2</sub>SiO, donde R es un átomo de hidrógeno o un grupo hidrocarburo. Los siloxanos pueden tener esqueletos ramificados (sustituidos) o no-ramificados (no-sustituidos) formados por átomos alternados de silicio y oxígeno -Si-O-Si-O-, con cadenas laterales R unidas a los átomos de silicio. También se conocen estructuras más complicadas, por ejemplo ocho átomos de silicio en las esquinas de un cubo, conectados por 12 átomos de oxígeno como los lados del cubo. Los siloxanos polimerizados con cadenas laterales orgánicas (R ≠ H) suelen conocerse como siliconas o como *polisiloxanos*. Ejemplos representativos son [SiO(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (polidimetilsiloxano) y [SiO(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (polidifenilsiloxano). Las cadenas orgánicas laterales les confieren propiedades hidrofóbicas mientras que el esqueleto -Si-O-Si-O- es puramente inorgánico. Las definiciones para siloxanos o polisiloxanos también son aplicables para los titanoxanos o polititanoxanos, donde el átomo de Si se sustituye por un átomo de Ti. Ventajosamente, la capa externa puede estar hecha de una primera capa de SiO<sub>2</sub> o TiO<sub>2</sub> y una capa siguiente de un siloxano o titanoxano diferente.

Los polímeros de polietilén glicol (PEG) son compuestos de poliéter con muchas aplicaciones desde la fabricación industrial hasta la medicina, con la fórmula general C<sub>2n+2</sub>H<sub>4n+6</sub>O<sub>n+2</sub>. También se los conoce como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE), en función de su peso molecular. El polivinil alcohol (PVOH, PVA, o PVAL) es un polímero sintético soluble en agua con la fórmula general (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>. Los polímeros de polietilén glicol pueden ser homopolímeros o cualesquiera co-polímeros de etilén glicol.

Según la presente invención, la al menos una biomolécula unida a la capa externa comprende una señal dirigida. La señal dirigida también se puede designar como una señal de reconocimiento molecular selectivo. En otras palabras

la biomolécula comprende una parte o sitio o región en la biomolécula que puede reconocer selectivamente, o detectar, un sitio o región correspondiente, de un material biológico. Un ejemplo de señal dirigida es un epítopo o un paratopo.

5 Un epítopo, también conocido como determinante antigénico; es la parte de un antígeno que es reconocida por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos, células B, o células T. La parte de un anticuerpo que reconoce el epítopo se llama paratopo. Aunque normalmente se cree que los epítomos derivan de proteínas no-propias, las  
10 secuencias derivadas del receptor que se pueden reconocer también se clasifican como epítomos. Los epítomos de antígenos de proteína se dividen en dos categorías, epítomos conformacionales y epítomos lineales, sobre la base de su estructura y su interacción con el paratopo. Un epítopo conformacional está compuesto de secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno. Estos epítomos interactúan con el paratopo por las características superficiales 3-D y la forma o estructura terciaria del antígeno. La mayor parte de los epítomos son conformacionales. Un paratopo es la parte de un anticuerpo que reconoce un antígeno, el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

15 En contraste, los epítomos lineales interactúan con el paratopo basándose en su estructura primaria. Los aminoácidos que componen un epítopo lineal son una secuencia continua de aminoácidos del antígeno.

20 La señal dirigida también puede ser un paratopo. Un paratopo es la parte de un anticuerpo que reconoce un antígeno, el sitio de unión a un antígeno de un anticuerpo.

En el contexto de la presente invención, la biomolécula puede imitar un epítopo o un paratopo.

25 Según la presente invención, la capa externa de material inerte está hecha de un óxido inorgánico o un polímero orgánico. El material inerte de la capa externa debe ser inerte en relación al agente de marcaje. Esto significa que según la presente invención, la capa no debería inhibir al agente de marcaje cuando lo detecta. Por lo tanto, el material inerte se puede escoger de un óxido inorgánico, como un óxido de titanio (Ti), zirconio (Zr), vanadio (V), cromo (Cr), silicio (Si).

30 Polímeros orgánicos, como los polímeros de polietilén glicol (PEG) sustituidos o no sustituidos (homopolímeros o cualquier copolímero), o polímeros de polivinil alcohol sustituidos o no sustituidos (homopolímeros o cualquier copolímero) también son materiales inertes adecuados para la capa externa de las partículas codificadas según la presente invención. En el contexto de la presente invención, el término "polímeros" se debe entender como cualquier homopolímero o cualquier copolímero.

35 La capa externa puede estar formada por al menos una capa de material inerte, tal como una capa, dos capas, tres capas, cuatro capas. Las interacciones entre las capas pueden ser covalentes o electrostáticas. Las capas de material inerte pueden formarse por auto-ensamblaje, adsorción física o por polimerización iniciada en la superficie.

40 Según la presente invención, la al menos una biomolécula unida a la capa externa se une a material biológico. El material biológico puede ser material biológico humano, material biológico animal o material biológico vegetal. Ventajosamente, la biomolécula se puede escoger para que se una selectivamente a un tipo particular de material biológico.

45 En el contexto de la presente invención, la al menos una biomolécula se une a la capa externa. El material biológico puede unirse a la capa externa por un enlace covalente, o por fuerzas electrostáticas y/o de van der Waals (también designadas como enlaces electrostáticos y/o de van der Waals).

50 En el contexto de la presente invención, una unión covalente se debe entender como un enlace químico entre la biomolécula y el material biológico. El enlace covalente incluye muchos tipos de interacciones, incluyendo enlace- $\sigma$ , enlace- $\pi$ , enlace metal a metal, interacciones agósticas, y enlaces de dos electrones entre tres centros, particularmente, entre átomos de electronegatividades similares.

55 En el contexto de la presente invención, fuerzas electrostáticas, o unión electrostática, se deben entender como fuerzas que ejercen cargas eléctricas entre sí. Dichas fuerzas se describen por la ley de Coulomb.

En el contexto de la presente invención, las fuerzas de van der Waals pueden permitir el enlace entre la biomolécula y el material biológico a través de un dipolo permanente y un correspondiente dipolo inducido (o fuerza de Debye) interacciones o fuerzas entre dos dipolos inducidos instantáneos (fuerzas de dispersión de London).

60 En el contexto de la presente invención, biomoléculas que contienen una parte hidrófila cargada (p.e. aniónica) y una parte hidrófoba pueden unirse al material biológico a través de fuerzas electrostáticas y de van der Waals.

Según la presente invención, el material biológico se escoge de células inmunes, membranas celulares, virus.

El material biológico puede ser o proceder de cualquier membrana celular. Una membrana celular es una membrana biológica que separa el interior de todas las células del entorno exterior. La membrana celular es permeable selectivamente a iones y moléculas orgánicas y controla el movimiento de sustancias hacia dentro y hacia fuera de las células. Consiste en una bicapa fosfolipídica con proteínas incrustadas. Las membranas celulares están implicadas en una gran variedad de procesos celulares como la adhesión celular, la conductividad iónica y el señalado celular y sirven como superficie de anclaje para el glicocáliz extracelular y la pared celular y el citoesqueleto intracelular.

Las células inmunes pueden ser de cualquier tipo. Las células T también se designan como linfocitos T y pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos, y juegan un papel central en la inmunidad mediada por células. Pueden distinguirse de otros tipos de linfocitos, como las células B y células asesinas (células NK) por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado *receptores celulares T* (TCR). La abreviatura *T*, en *célula T*, quiere decir timo, ya que este es el principal órgano responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto diferentes subconjuntos de células T, cada uno con una función distinta. Las células B son linfocitos que juegan un importante papel en la respuesta inmune humoral (a diferencia de la respuesta inmune mediada por células, que se rige por las células T). Las principales funciones de las células B son producir anticuerpos contra los antígenos, llevando a cabo la función de células presentadoras de antígeno (APC) y, finalmente, se convierten en células de memoria B después de la activación por interacción con el antígeno. Las células B son un componente esencial del sistema inmune adaptativo.

Un virus es un agente infeccioso que se puede replicar sólo dentro de las células vivas de organismos. Los virus infectan todo tipo de organismos, desde animales y plantas a bacterias y arqueas. Los virus consisten en dos o tres partes: el material genético compuesto de ADN o ARN, macromoléculas que portan información genética, una capa de proteína que protege estos genes, y en algunos casos una envoltura de lípidos que rodea la capa de proteínas cuando están fuera de una célula. Las formas de los virus van desde simples formas helicoidales e icosaédrica a estructuras más complejas. Un virus promedio es alrededor de una centésima el tamaño de una bacteria promedio.

Según la presente invención, la partícula codificada comprende por lo menos por dos núcleos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez núcleos. Los núcleos metálicos pueden ser agregados. Ventajosamente, por lo menos uno de estos núcleos metálicos es un núcleo metálico con forma de estrella.

Según la presente invención, el núcleo metálico comprende plata y/o oro, o sus aleaciones.

El núcleo metálico puede estar hecho de plata (Ag), o oro (Au), o de una aleación de plata y oro (AgAu), o de una aleación de plata, como AgM, o de una aleación de oro (AuM), o una aleación de plata y oro, y al menos otro metal (AgAuM), donde M es al menos un metal elegido de los elementos de transición de la tabla de elementos químicos. Se pueden elegir metales del grupo: Co, Ni, Pd, Pt, Cu.

Según la presente invención, la partícula codificada de la presente invención puede tener cualquier tamaño total o forma, así como cualquier tamaño entre 30 nanómetros (nm) y 20 micrómetros (µm).

Según la presente invención, el tamaño del núcleo metálico se encuentra en el rango de 10 nm a 2000 nm, como el de cualquier tamaño por encima de 10 nm, o superior a 20 nm, así como cualquier tamaño inferior a 2000 nm, o por debajo de 1000, o por debajo 500 nm. El tamaño del núcleo metálico se puede ajustar. Se pueden obtener buenos resultados con las partículas de cualquier tamaño o forma. Si el núcleo metálico tiene una forma que comprende picos, designada como en forma de estrella, se pueden obtener resultados especialmente buenos.

Según la presente invención, el agente de marcaje comprende un grupo aromático. Un grupo aromático puede ser cualquier hidrocarburo cíclico conjugado.

El agente de marcaje, o molécula de marcaje, es cualquier molécula capaz de proporcionar un código o un señal detectable por absorción de luz ultravioleta, absorción de luz visible, absorción de luz infrarroja, absorción-reflectancia infrarroja aumentada por superficie (SEIRA), emisión de luz fluorescente, emisión de luz fosforescente, dispersión Raman, dispersión Raman aumentada por superficie mayor (SERS), resonancia de dispersión Raman aumentada por superficie (SERRS), dispersión de Rayleigh.

La detección en el contexto de la presente invención puede llevarse a cabo en una celda de microfluidos o una celda de la citometría de flujo.

El agente de marcaje puede venir dado por las moléculas de marcaje, tales como tioles aromáticos, seleniuro, telururos, cianuros, aminas, ácidos carboxílicos y otros, incluyendo sistemas moleculares no-resonantes (con la luz



de excitación) y colorantes orgánicos y organometálicos. El agente de marcaje se puede elegir de entre el grupo de las acridinas, antraquinonas, arilmetanos, colorantes azo, colorantes diazonio, colorantes nitro o nitroso, ftalocianinas, quinona-iminas, indaminas, tiazoles, xantenos, fluorenos, pironinas, rodaminas o perilenos, y sus derivados.

Según otro aspecto de la invención, el método para la preparación de una partícula codificada comprende: iv) unir directamente o indirectamente al menos

- i) preparar un núcleo metálico con un tamaño y forma definidos;
- ii) unir un agente de marcaje a dicho núcleo metálico proporcionando un núcleo metálico marcado;
- iii) encapsular dicho núcleo metálico marcado con una capa externa de material inerte;
- iv) una biomolécula en la superficie de dicha capa externa.

Ventajosamente, el paso i) se lleva a cabo en agua, preferiblemente desionizada, o un medio acuoso alcohólico. El paso i) se lleva a cabo a través de la reducción de una sal metálica con el agente reductor apropiado. Este medio de agua o acuoso también es adecuado para el siguiente paso del procedimiento según la presente invención.

Ejemplos de sales metálicas son  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{AgClO}_4$ ,  $\text{HAuCl}_4$ . Ejemplos de agentes reductores son  $\text{NaBH}_4$ , citrato sódico, ácido ascórbico, la hidracina. La forma y el tamaño definidos, o predefinidos, están determinados por las condiciones de reacción de la preparación del núcleo metálico (se entiende que aquí se prepara más de un núcleo simultáneamente, en i)).

El paso ii) se lleva ventajosamente a cabo por chemisorción a través de enlace químico o de complejación con el metal en medio acuoso.

El paso iii) se realiza ventajosamente por medio de química sol-gel. La química sol-gel consiste en la hidrólisis y la condensación de alcoxisilanos en una mezcla de agua, etanol y amoníaco. Ejemplos de alcoxisilanos son tetraetoxisilano, aminopropiltrietoxisilano o mercaptopropiltrietoxisilano.

El paso iv) es ventajosamente llevado a cabo por autoensamblaje (previamente funcionalizado con un mercaptosilano) o por protocolos de capa sobre capa.

El método para la preparación de la partícula codificada según la presente invención puede comprender una etapa III2) entre la etapa iii) y la etapa iv), que incluye la fijación de un conector químico entre la capa externa y la biomolécula. Ventajosamente, el conector químico es una cadena alquilo que comprende de uno a seis átomos de carbono funcionalizada a cada extremo de la cadena por un grupo funcional tal como se define en el contexto de la presente invención. El conector químico también puede ser un siloxano funcionalizado o titanoxano tal como se define en el contexto de la presente invención.

El método según la presente invención prepara la partícula codificada según la presente invención. En consecuencia, todas las ventajas, especificaciones y preferencias definidas por la partícula codificada de la presente invención son aplicables al método según la invención para la preparación de la partícula codificada.

Las condiciones del método para la preparación de la partícula codificada y las características de la partícula codificada (tales como el tamaño y forma del núcleo metálico, la selección del agente de marcaje, la selección de la capa externa, una posible funcionalización de la capa externa o su biocompatibilidad) pueden depender de cada aplicación específica. Según la presente invención, el método para la preparación de una partícula codificada comprende la preparación de un lote de partículas codificadas.

Ventajosamente, suspensiones de núcleos metálicos donde el núcleo metálico consta de picos, proporcionando forma de estrella al núcleo metálico, se puede preparar por el método de la invención.

Según la presente invención, la etapa iv) es seguida por una etapa v) que comprende la unión covalente de al menos una de las biomoléculas de interés a la capa externa. La unión covalente de biomoléculas como se definió anteriormente, también se puede designar como biofuncionalización de las partículas codificadas. Las partículas codificadas según la presente invención en el contexto de la presente invención pueden ser designadas como partículas codificadas biofuncionalizadas.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una microesfera codificada que comprende al menos dos partículas codificadas según la presente invención que comprende:

- i) preparar al menos dos núcleos metálicos con un tamaño y forma definidos;
- ii) unir un agente de marcaje a cada uno de los al menos dos núcleos metálicos proporcionando al menos dos núcleos metálicos marcados;
- iii) incrustar al menos dos núcleos metálicos marcados en una capa de material inerte;
- iv) unir al menos dos núcleos metálicos marcados encapsulados obtenidos en iii) sobre una microesfera de sílice ( $\text{SiO}_2$ );
- v) encapsular al menos dos núcleos metálicos marcados unidos a la microesfera de sílice con una capa externa de material inerte;
- vi) unir al menos una biomolécula en la superficie de la capa externa prevista en v).

En la etapa iv), la microesfera de sílice puede tener cualquier diámetro. Ventajosamente, el diámetro es del orden de 500 nm y 10000 nm.

Otro aspecto de la invención está relacionado con microesferas codificadas obtenibles por el método para la preparación de microesferas codificadas según la presente invención. Una microesfera también puede ser designada como microbead, o micropartícula en el contexto de la presente invención. Encapsular, en el contexto de la presente invención y en cualquier aspecto de la presente invención, se debe entender como recubrir con una capa de material inerte o con una capa externa de material inerte.

El método para preparar una microesfera codificada según la presente invención obtiene la microesfera codificada usando las partículas codificadas según la invención o que puedan obtenerse por el método de la invención. En consecuencia, todas las ventajas, especificaciones y preferencias definidas por la partícula codificada de la invención o el método para la obtención de la partícula codificada, son aplicables al método según la invención para la preparación de la partícula codificada.

Según otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la detección de material biológico. El material biológico se une a las partículas codificadas, o a las microesferas codificadas, y es detectado por la presencia de las partículas codificadas, o a las microesferas codificadas. El método para la detección según la presente invención proporciona las ventajas de que es un método flexible adecuado para diferentes técnicas de detección y proporciona una fuerte señal de detección. En consecuencia, el método para la detección de material biológico que comprende las etapas de:

- 1) inmovilizar una partícula codificada o una microesfera codificada, según la invención u obtenida según el método de la invención, o sobre una superficie;
- 2) localizar dicha partícula codificada o microesfera codificada;
- 3) poner en contacto la superficie sobre la que se inmoviliza la partícula codificada o la microesfera codificada, con un medio que contiene un material biológico;
- 4) localizar la partícula codificada o la microesfera codificada unida al material biológico.

El método para la detección de material biológico según la presente invención detecta el material biológico a través de la presencia de una partícula codificada, o una microesfera codificada, según la presente invención. En consecuencia, todas las ventajas, especificaciones y preferencias definidas por la partícula codificada, o la microesfera codificada, de la presente invención son aplicables al método descrito en la invención para detectar material biológico.

En el método de la presente invención, el método de detección comprende un paso 1) en el que las partículas codificadas, o de las microesferas codificadas, según la presente invención, son inmovilizadas sobre una superficie, como una superficie de vidrio o una superficie de silicio. La fijación de las partículas o microesferas a la superficie se lleva a cabo por auto-ensamblaje o ensamblaje dirigido por interacciones electrostáticas. La superficie puede ser de cualquier material, como vidrio, una superficie de silicio, superficies metálicas, o de un material polimérico, plano o conformado a través de cualquier método litográfico o no litográfico.

El paso 2) implica que las partículas codificadas, o microesferas codificadas, están localizadas, por tanto son detectables y por consiguiente identificables por cualquier técnica de detección, como la absorción de luz ultravioleta, la absorción de luz visible, de absorción de luz infrarroja, de absorción-reflectancia de infrarrojos

aumentada por superficie, la emisión de luz fluorescente, la emisión de luz fosforescente, la dispersión Raman, dispersión Raman aumentada por superficie, dispersión Raman de resonancia aumentada por superficie, la dispersión Rayleigh.

5 El paso 3) se lleva a cabo poniendo en contacto la superficie sobre la que se ha unido la partícula codificada o la microesfera codificada, con un medio que contiene el material biológico. Ventajosamente, el medio es un medio acuoso en el que el material biológico puede encontrarse en suspensión. El material biológico se une entonces a la partícula codificada, a través de enlaces covalentes, o de interacciones electrostáticas y/o fuerzas de van der Waals.

10 El material biológico puede ser cualquier material biológico. El material biológico puede originarse a partir de material biológico humano, material biológico animal, material biológico de origen vegetal. El material biológico se puede originarse a partir de microorganismos, bacterias, virus.

15 En el paso 4), la localización de la partícula codificada unida al material biológico, que permite la detección de material biológico a través de la presencia de la partícula codificada, o la microesfera codificada, fijada sobre la superficie, se lleva a cabo por cualquier técnica de detección con el fin de detectar la partícula codificada, o la microesfera codificada, y el sustrato.

20 Una de las técnicas de detección para la detección de las partículas codificadas, o de las microesferas codificadas, es la espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie (SERS). El núcleo metálico genera el campo electromagnético necesario para aumentar la señal Raman del agente de marcaje, o molécula etiquetada, una vez excitada con la luz adecuada. Núcleos metálicos de plata y/u oro y sus aleaciones poseen resonancias de plasmen superficial localizadas radiactivas, en el espectro visible o infrarrojo. Además, la baja toxicidad, estabilidad y una alta eficiencia óptica de los núcleos metálicos según la presente invención, permite la mejora en la detección del agente  
25 marcador alrededor de al menos un núcleo metálico. En consecuencia, cuando la capa externa se une a una biomolécula, la detección SERS puede identificar el agente marcador solo, o una combinación del agente marcador y la biomolécula.

30 Según la presente invención, el método de detección implica la localización de acuerdo a los pasos 2) y/o 5) y requiere la detección mediante al menos una técnica de detección del grupo formado por: espectroscopia de absorción y/o espectroscopia de absorción-Reflectancia infrarroja aumentada por superficie y/o espectroscopia de emisión de luz fluorescente y/o emisión de luz fosforescente y/o dispersión Raman, y/o espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie, y/o espectroscopia de dispersión Raman resonante aumentada por superficie, y/o  
35 espectroscopia de dispersión Rayleigh.

Ventajosamente, se pueden utilizar dos o tres técnicas de detección al mismo tiempo o por lo menos sustancialmente al mismo tiempo. Si las dos o tres técnicas de detección se llevan a cabo sustancialmente al mismo tiempo, se debe entender que se llevan a cabo una tras otra, pero en una misma muestra dentro de la misma región de una muestra.

40 Ventajosamente, una de estas técnicas es la espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie o la espectroscopia de dispersión Raman resonante aumentada por superficie.

45 La espectroscopia de absorción se refiere a las técnicas espectroscópicas que miden la absorción de la radiación, en función de la frecuencia o la longitud de onda, debido a su interacción con la muestra. La muestra absorbe energía, es decir, los fotones, del campo de la radiación. La intensidad de la absorción varía en función de la frecuencia, y esta variación es el espectro de absorción. La espectroscopia de absorción se realiza a través del espectro electromagnético. La espectroscopia de absorción se emplea para determinar la presencia de una sustancia en una muestra y, en muchos casos, para cuantificar la cantidad de sustancia presente. Las  
50 espectroscopias infrarroja y ultravioleta-visible son particularmente comunes en las aplicaciones analíticas. Existe una amplia gama de aproximaciones experimentales para medir los espectros de absorción. El diseño más común consiste en dirigir un haz de radiación sobre una muestra y detectar la intensidad de la radiación que pasa a través de ella. La energía transmitida se puede utilizar para calcular la absorción. La fuente, la disposición de la muestra y la técnica de detección varían considerablemente en función del rango de frecuencia y el propósito del experimento.

55 La espectroscopia de absorción-reflectancia infrarroja aumentada por superficie (SEIRA) utiliza la luz visible y una óptica reflectante para visualizar una imagen ampliada de una muestra y para seleccionar una superficie microscópica de la muestra para el análisis por espectroscopia de reflexión-absorción infrarroja. La selección de la zona se basa en una serie de propiedades físicas y otras características materiales de la superficie de la muestra.  
60 Una vez que se ha seleccionado el área de la muestra, la información molecular de la superficie seleccionada se puede almacenar espectroscópicamente en la región espectral infrarroja.

La espectroscopia de fluorescencia de emisión, también denominada espectroscopia de fluorescencia, o fluorometría o espectrofluorometría, es un tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra. Se utiliza un haz de luz, por lo general la luz ultravioleta, que excita los electrones en las moléculas de ciertos compuestos y los hace emitir luz de una energía más baja, por lo general, pero no necesariamente, la luz visible. Una técnica complementaria es la espectroscopia de absorción. La espectroscopia de emisión de fosforescencia es una técnica similar para medir la fosforescencia, es decir, un tipo específico de fotoluminiscencia relacionada con la fluorescencia. A diferencia de fluorescencia, un material fosforescente no reemite inmediatamente la radiación que absorbe. Las escalas de tiempo más bajas de la re-emisión se asocian con transiciones entre estados energéticos "prohibidas" en mecánica cuántica. Dado que estas transiciones se producen con relativa lentitud en ciertos materiales, la radiación absorbida puede ser reemitida con menor intensidad hasta varias horas después de la excitación inicial.

La espectroscopia de dispersión Rayleigh mide la dispersión elástica de la luz o radiación electromagnética por partículas más pequeñas que la longitud de onda de la luz, que pueden ser átomos individuales o moléculas. Puede ocurrir cuando la luz viaja a través de sólidos y líquidos transparentes, pero es más frecuentemente observado en gases. La dispersión Rayleigh depende de la polarizabilidad eléctrica de las partículas. La dispersión originada por partículas similares o mayores que la longitud de onda de la luz se puede explicar mediante la teoría de Mie, o la aproximación de dipolos discretos.

La espectroscopia de dispersión Raman es una técnica espectroscópica usada para el estudio vibracional, rotacional y de otros modos de baja frecuencia en un sistema. Esto depende de la dispersión inelástica, o la dispersión Raman, de luz monocromática, normalmente desde un láser en el intervalo del visible, infrarrojo cercano o ultravioleta cercano. La luz del láser interacciona con un sistema molecular perdiendo energía en forma de vibraciones, fotones u otras excitaciones en el sistema, dando como resultado un desplazamiento, hacia arriba o hacia abajo de la energía de los fotones del láser. El desplazamiento en energía proporciona información sobre el sistema. La espectroscopia de infrarrojo produce información similar pero complementaria. Por lo general, la muestra es iluminada con un rayo láser. La luz del punto iluminado se recoge con una lente y es enviada a través de un monocromador. Las longitudes de onda cercanas a la línea del láser se han de filtrar, debido a la dispersión elástica de Rayleigh, mientras que el resto de la luz recogida se dispersa sobre un detector, por muescas o por el borde del filtro para el láser y los espectrógrafos (ya sea transmisible axial (A), monocromador Czerny- Turner (TC)) o FT (basada en la espectroscopia por transformada de Fourier), y recogidos en los detectores de fotones (incluidos los tubos fotomultiplicadores, matrices de diodos, CCD u otros). Tipos avanzados de espectroscopia de Raman, incluyen la espectroscopia de dispersión Raman resonante, la de dispersión Raman aumentada en superficie, la de dispersión Raman resonante aumentada en superficie, la dispersión Raman aumentada por puntas, dispersión Raman polarizada, dispersión Raman estimulada (similar a la emisión estimulada), la transmisión Raman, Raman con desplazamiento espacial, Raman coherente anti-Stokes e hiper-Raman.

En el contexto de la presente invención, la espectroscopia de dispersión Raman aumentada por superficie (SERS) y la espectroscopia de dispersión Raman resonante aumentada por superficie (SERRS) ofrecen ventajas únicas, como la detección ultrasensible, un número ilimitado de códigos ya que los espectros SERS / SERRS son esencialmente las huellas dactilares de vibración, únicas para cada molécula, que se pueden acoplar a otras técnicas de análisis, como las técnicas inmunológicas (ELISA, RIA o la FIA).

Según la presente invención, la detección se lleva a cabo en una celda de microfluidos o en una celda de citometría de flujo.

Una celda de microfluidos es una celda o un recipiente adecuado para la microfluídica, u otras aplicaciones donde el control preciso y la manipulación de fluidos son geométricamente restringidos a una pequeña escala, por lo general inferior al milímetro.

Una celda de citometría de flujo es una celda, o un recipiente adecuado para llevar a cabo la citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica utilizada para contar y examinar partículas microscópicas, como células y cromosomas, mediante la suspensión en una corriente de fluido y pasándolas por un aparato electrónico de detección. Esto permite el análisis simultáneo multiparamétrico de las características físicas y químicas de hasta miles de partículas por segundo. La citometría de flujo se utiliza de forma rutinaria en el diagnóstico de trastornos de la salud, especialmente cáncer en la sangre, pero tiene muchas otras aplicaciones en investigación y en la práctica clínica.

En otro aspecto de la invención, la partícula codificada se utiliza en la detección espectroscópica o microscópica *in vitro*, de la presencia de microorganismos, preferiblemente bacterias o virus.

En otro aspecto de la invención, la partícula codificada se utiliza en la detección espectroscópica o microscópica de agentes patógenos o células inmunogénicas, o anticuerpos.

En otro aspecto de la invención, la partícula codificada se utiliza en la detección espectroscópica y microscópica de hormonas, o lípidos, o liposacáridos o sacáridos.

5 En otro aspecto de la presente invención, la partícula codificada se utiliza en la detección espectroscópica o microscópica de reacciones químicas en un locus genómico dirigido.

En otro aspecto de la presente invención, la microesfera codificada se utiliza en la detección espectroscópica o microscópica *in vitro*, de la presencia de microorganismos, preferiblemente bacterias o virus.

10 En otro aspecto de la presente invención, la microesfera codificada se utiliza en la detección espectroscópica o microscópica de agentes patógenos o células inmunogénicas, o anticuerpos.

En otro aspecto de la presente invención, la microesfera codificada se utiliza en la detección espectroscópica y microscópica de hormonas, o lípidos, o liposacáridos o sacáridos.

15 En otro aspecto de la presente invención, la microesfera codificada se utiliza en la detección espectroscópica o microscópica de reacciones químicas en un locus genómico dirigido.

20 Los usos mencionados no son limitativos de ninguna manera. Además, la partícula codificada y/o la microesfera según la presente invención, pueden ser utilizadas para otros fines. En consecuencia, en el contexto de la presente invención, todas las ventajas, características y preferencias definidas para la partícula codificada y/o para la microesfera codificada, de la presente invención son aplicables a todos los métodos y usos según la invención, en relación con la partícula codificada y/o la microesfera codificada.

25 La presente invención está ilustrada, sin estar limitada, por los siguientes Ejemplos y figuras.

### Figuras

Figura 1

30 Imágenes de TEM de nanopartículas de oro (A) esféricas, y (B) en forma de estrella codificadas con azul de toluidina y cubiertas con una capa de sílice. (C) espectros de resonancia de plasmón superficial localizada de nanoesferas y nanoestrellas, recién preparados (línea punteada) y después de la codificación y deposición de la capa de sílice (línea continua). La flecha punteada indica la longitud de onda de la línea láser de excitación. (D) Espectros SERS de las esferas y las estrellas codificadas, una vez excitadas con una línea de láser de IR cercano, 830 nm.

Figura 2

40 Imagen de TEM, espectro de resonancia de plasmón superficial localizada y respuesta SERS de un núcleo submicrométrico en forma de estrella siempre con el marcaje de azul de toluidina (TB) y una capa de sílice.

Figura 3

45 Esquema de detección de sustratos de interés, es decir, marcadores patológicos, con experimentos en suspensión o en una micromatriz. (A) Protección-funcionalización y bioconjugación de SiO<sub>2</sub>@SSP o SPP sumicrométricas. (B) Diferentes núcleos codificados, cada uno con un solo anticuerpo, se ponen en contacto con el fluido biológico de interés. Después de lavar las partículas, se añaden los anticuerpos de detección con marcaje fluorescente, y la muestra se lava de nuevo. Una alícuota se deposita en un portaobjetos de vidrio y se lleva a cabo el barrido con dos líneas láser. La línea láser de 488 nm provoca la fluorescencia de las partículas que han reaccionado. Los anticuerpos que han reaccionado se identifican por el código de barras SERS de la partícula (785 nm). (C) Fabricación de una micromatriz para ELISA. La muestra de partículas se deposita sobre un chip de silicio microperforado con una espátula de punta de goma bajo un microscopio óptico. La matriz se pone en contacto, primero con el fluido biológico de interés, se lava y luego se pone en contacto con los anticuerpos de detección con marcaje fluorescente. La micromatriz se barre entonces con dos líneas de láser: la línea de láser de excitación de 488 nm provoca fluorescencia en las partículas que han reaccionado, mientras que el anticuerpo que ha reaccionado es identificado por el código de barras SERS de la partícula (785 nm).

Figura 4

60 Partículas codificadas para identificar fármacos activos en bibliotecas combinatorias complejas. (A) Partícula codificada en síntesis peptídica de fase sólida estándar con 9-fluorenil-metoxycarbonil (Fmoc-SPPS) (B) Identificación por SERS y clasificación de la biblioteca peptídica: (B1) espectros SERS de P1, P2 y Pn, asignación de bandas (composición) y elucidación estructural (estructura primaria, es decir, secuencia), (B2) fotografía óptica de

una mezcla de partículas codificadas cada una con un solo péptido; y (B3) clasificación SERS de las partículas codificadas (C) Prueba de concepto de la adecuación de este método para el descubrimiento de fármacos. En resumen, el sustrato biológico, en este caso estreptavidina-fosfatasa alcalina (SAP), marcada con una sonda fluorescente (FAI) se pone en contacto con un grupo de granos que portan péptidos diferentes. La SAP se une de forma selectiva al péptido de interés. Esta unión se detecta por fluorescencia (excitando la muestra con la línea láser de 488 nm). Cada péptido activo se identifica a través de su espectro SERS excitando la muestra con la línea láser de 633 nm. Esta línea está muy lejos de las bandas de absorción del marcador, por lo que no se espera emisión electrónica.

Figura 5

Imágenes de TEM que muestran la captación celular de (A, C) Au-nanoesfera-TB@SiO<sub>2</sub>, y (B, D) SSP-TB@SiO<sub>2</sub> (Figura 1). La barra de escala representa 1 micra. Imágenes ópticas y mapas SERS de cortes ultrafinos de una película que contiene las células HeLa teñidas de (E) Au-nanoesferas-TB@SiO<sub>2</sub>, y (F) SSP-TB@SiO<sub>2</sub>. Mapa SERS (intensidad de la línea base a 1419 cm<sup>-1</sup>, 70 x 70 μm<sup>2</sup>, tamaño de paso de 1 μm) adquirido utilizando una línea de excitación láser de 830 nm.

Figura 6

Ejemplo de traceo de consumibles. Imágenes ópticas de tejidos codificados con SSP@SiO<sub>2</sub> portando diferentes moléculas codificadoras. Análogamente, la codificación se puede realizar en papel, plástico o cualquier otra superficie sólida. Línea más clara: espectros SERS de la SSP codificada recién preparada; Línea más oscura: espectros SERS de la SSP codificada sobre el tejido.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Preparación del núcleo metálico

Las nanopartículas en forma de estrella, o nanoestrellas se preparan mediante la adición de semillas de oro con cualquier morfología y 1o tamaño recubiertas con PVP, se dispersan en etanol u otro disolvente en una mezcla de HAuCl<sub>4</sub> y PVP en DMF con agitación rápida a temperatura ambiente. En el tiempo comprendido entre 20 min a 10 h, el color de la disolución cambia indicando la formación de las nanopartículas en forma de estrella. Es posible obtener cualquier forma y tamaño de partícula en función del tamaño y la forma de la semilla utilizada. Las partículas finales y la forma final, así como las propiedades ópticas, dependen del tamaño y la forma inicial de las semillas utilizadas.

### Ejemplo 2 - Marcaje y recubrimiento con sílice del núcleo metálico

Las nanopartículas en forma de estrella, preparadas según el Ejemplo 1 de la presente invención se protegen añadiendo un polietilenglicol tiolado, mPEGSH, (calculado para proporcionar 4 moléculas/nm<sup>2</sup>) a las nanopartículas en forma de estrella. La muestra se agita, se centrifuga y se redispersa en etanol. A continuación, se añade el código molecular gota a gota con agitación suave a las nanopartículas en forma de estrella estabilizadas con PEG. Inmediatamente después de la adición del código molecular, el recubrimiento con sílice se lleva a cabo a través de un proceso sol-gel mediante la mezcla de las nanopartículas en forma de estrella estabilizadas con PEG con una disolución de etanol/amoníaco y la adición posterior de tetraetoxisilano. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante 24 h, a continuación las partículas se centrifugan y se lavan con etanol. Cuando el tiempo de la reacción ha terminado, las partículas se centrifugan y se lavan con etanol.

### Ejemplo 3 - Deposición, marcaje y protección de los coloides sobre microesferas de SiO<sub>2</sub>

Las nanopartículas en forma de estrella se adsorben sobre microesferas (previamente funcionalizadas con un mercapto silano) mediante autoensamblaje o mediante protocolos capa-sobre-capas. Las isothermas de adsorción determinan las condiciones necesarias para maximizar la densidad de nanopartículas. Los materiales así preparados tienen aplicaciones en la síntesis en fase sólida y aplicaciones en el descubrimiento de fármacos. Para los sensores de tipo llave-cerradura, los marcadores espectroscópicos (colorantes o tioles aromáticos) son entonces quimiadsorbidos sobre las microesferas compuestas siguiendo el protocolo de isoterma de adsorción. El sistema activo resultante se protege finalmente con una capa delgada de SiO<sub>2</sub> para evitar la lixiviación de los marcadores, mejorar la estabilidad en medio acuoso, y facilitar la funcionalización para otras aplicaciones. En este caso, el espesor de SiO<sub>2</sub> se controla con precisión para obtener microesferas homogéneas finales que, además, puedan actuar como potenciadores de la fluorescencia.

Ejemplo 4 - Síntesis en fase sólida y descubrimiento de fármacos con nanopartículas construidas sobre microesferas o partículas codificadas para el barrido de alto rendimiento y sensores de tipo llave-cerradura

Las partículas submicrométricas en forma de estrella marcadas y protegidas por un recubrimiento de sílice externo obtenidas según el Ejemplo 2 y/o las microesferas compuestas obtenidas según el Ejemplo 3 se funcionalizan con un mercaptoácido alifático de cadena corta o una amina, proporcionando un grupo funcional adecuado (-COOH, -NH<sub>2</sub>, OH, Cl, u otros) para la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) y se une a los aminoácidos. La fijación del primer aminoácido se realiza de la siguiente manera. El correspondiente aminoácido modificado con ácido fluorenilmetiloxycarbonil (aminoácido-Fmoc), hidroxibenzotiazol (HOBT) y diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) se disuelven en dimetilformamida (DMF) y se dejan en reposo durante 10 minutos. A continuación, la mezcla se añade a las partículas (suspendidas en DMF) y se deja reaccionar durante varias horas. A continuación se acoplan los aminoácidos en condiciones estándar de SPSS, utilizando HBTU / DIEA (AA/HBTU/DIEA-4/3, 8/8) en DMF. La fijación de los péptidos a las microesferas compuestas se confirma por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas LC/MS (m/z) y resonancia magnética nuclear RMN, tras obtener una pequeña muestra peptídica por escisión del soporte sólido con TFA 95%.

La detección se realiza colocando una mezcla de partículas (cada una con un péptido diferente), en un portaobjetos de vidrio y mapeando cada partícula con un microespectrómetro Raman con láser rojo o infrarrojo cercano para evitar daños en la muestra. La clasificación y elucidación de la naturaleza peptídica se lleva a cabo mediante análisis de vibración convencionales.

Ejemplo 5 - Sistemas inmunológicos para la detección de patógenos

La funcionalización adecuada de las partículas se consigue mediante silanización de la superficie de SiO<sub>2</sub> de las partículas, con funciones amino o ácido, siguiendo los procedimientos de bioconjugación estándar en suspensión acuosa (es decir, química de carbodiimida, con 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, EDC, y N-hidroxibenzotriazol, HoBt, como agentes de acoplamiento) de un antígeno de captura (diagnóstico) o anticuerpos (biodetección) (Fig. 3A).

Las micropartículas codificadas se utilizan como plataformas para los sensores tipo sándwich llave-cerradura con aplicaciones en diagnóstico y detección. En pocas palabras, cada partícula codificada porta un marcador específico de un determinado patógeno, tumor o enfermedad. Las micropartículas se ponen en contacto directamente con el fluido biológico de interés, o incorporado en una matriz microporfilada. Después de un lavado cuidadoso, las partículas o matrices se sumergen en una disolución que contiene un marcador fluorescente (anticuerpo o antígeno), se lava otra vez y luego se mapea con un microespectrómetro Raman con dos líneas de láser diferentes: un láser azul (488 nm), para detectar la fluorescencia de las partículas que han reaccionado, y una roja (633 nm) o láser infrarrojo (785 nm) para identificar los agentes o los marcadores de la enfermedad concreta. Esta aproximación presenta numerosas ventajas respecto a las técnicas convencionales. La intensidad de los espectros SERS/SERRS es muy alta, lo cual permite tiempos de detección muy cortos, del orden de milisegundos. Por otra parte, aprovechando la presencia de las nanopartículas, se debería obtener también la fluorescencia aumentada por superficie del colorante de detección. Se han descrito mejoras en torno a 100 veces (en comparación con la espectroscopía de fluorescencia láser normal, de alrededor 20 veces la de los microscopios de fluorescencia normal, dando lugar a un factor de mejora final de cerca de 2000 veces), a la distancia óptica optimizada entre la sonda (nanopartícula) y la molécula. Esta última permite una dramática disminución en la sensibilidad (la cantidad de agente/marcador de enfermedad presente detectado) con límites de detección por debajo de concentraciones picomolar o femtomolar (Fig. 4).

Ejemplo 6 - Cultivo celular y captura de nanopartículas

Se ponen en contacto organismos celulares, tejidos u órganos con las partículas codificadas funcionalizadas o no. Los cultivos se incuban con nanopartículas dispersas en un medio de cultivo celular siempre a una concentración de 6 nM (en placas de cultivo celular de 3 cm) durante 2 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>.

Ejemplo 7 - Uso de las partículas codificadas para la codificación y la trazabilidad de dinero, documentos y consumibles

Las partículas codificadas previamente descritas se dispersan en la concentración adecuada con polímeros transparentes con las propiedades adecuadas para ser adsorbidos en la superficie deseada. El proceso de codificación comprende impresión, recubrimiento por rotación, recubrimiento por inmersión de una película sobre una superficie deseada. (figura 5 y 6).

# REIVINDICACIONES

1. Partícula codificada que comprende:
  - 5 a) al menos un núcleo metálico;
  - b) un agente de marcaje unido a la superficie de dicho núcleo metálico, proporcionando un núcleo metálico marcado;
  - 10 c) una capa externa de un material inerte que encapsula a dicho núcleo metálico marcado; y
  - d) al menos una biomolécula directamente o indirectamente unida a dicha capa externa.
- 15 2. Partícula codificada según la reivindicación 1, donde la forma del núcleo metálico es esférica, o elipsoidal, o cónica, o cilíndrica, o cúbica, o cuboide, o piramidal de base cuadrada, o piramidal de base triangular, o prismática triangular, o prismática octagonal.
- 20 3. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el núcleo metálico posee una superficie dotada de al menos una punta.
4. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos una biomolécula unida a la capa externa se escoge del grupo aminoácidos, proteínas, péptidos, carbohidratos, hormonas, lípidos.
- 25 5. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la al menos una biomolécula directamente unida está unida covalentemente a la capa externa.
- 30 6. Partícula codificada según la reivindicación 5, donde la al menos una biomolécula está unida a la capa externa por un enlazador que comprende al menos un grupo funcional escogido del grupo -OH, -SH, -SeH, -TeH, -COOH, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria.
- 35 7. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la al menos una biomolécula está indirectamente unida a la capa externa a través de una capa de material inerte que contiene la partícula marcada codificada incrustada en su interior.
- 40 8. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la al menos una biomolécula unida a la capa externa comprenda una señal dirigida.
9. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el material inerte es un óxido inorgánico o un polímero orgánico.
- 45 10. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la al menos una biomolécula unida a la capa externa está unida al material biológico.
11. Partícula codificada según la reivindicación 12, donde el material biológico se escoge de células inmunes, membranas celulares, virus.
- 50 12. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo al menos dos núcleos metálicos.
13. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el núcleo metálico comprende plata y/u oro o sus aleaciones.
- 55 14. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el tamaño del núcleo metálico está en el intervalo 10 nm a 2000 nm.
15. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el agente de marcaje comprende un grupo aromático.
- 60 16. Partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde el material inerte de la capa externa se escoge del grupo siloxano, titanoxano, polímeros de polietilén-glicol, polímeros de polivinil-alcohol.
17. Método para preparar una partícula codificada por cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende:



- i) preparar un núcleo metálico con una forma y tamaño definidos;
  - ii) unir un agente de marcaje a dicho núcleo metálico proporcionando un núcleo metálico marcado;
  - 5    iii) encapsular el mencionado núcleo metálico marcado con una capa externa de material inerte;
  - iv) unir directamente o indirectamente al menos una biomolécula en la superficie de dicha capa externa.
18. Método para preparar una microesfera codificada que comprende al menos dos partículas codificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende:
- 10    i) preparar al menos dos núcleos metálicos con forma y tamaño definidos;
  - 15    ii) unir un agente de marcaje a cada uno de los al menos dos núcleos metálicos proporcionando al menos dos núcleos metálicos marcados;
  - iii) incrustar cada uno de los dichos al menos dos núcleos metálicos marcados en una capa de material inerte;
  - 20    iv) unir los al menos dos núcleos metálicos marcados encapsulados obtenidos en iii) sobre una microesfera de sílice;
  - v) encapsular los al menos dos núcleos metálicos marcados unidos a la microesfera de sílice con una capa externa de material inerte; vi) unir al menos una biomolécula en la superficie de la capa externa creada en v).
- 25    19. Microesfera codificada obtenible por el método según la reivindicación 18.
20. Método para la detección de material biológico que comprende los siguientes pasos:
- 30    1) inmovilizar una partícula codificada como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una microesfera codificada como se define en la reivindicación 19, sobre una superficie;
  - 2) localizar dicha partícula codificada o dicha microesfera codificada;
  - 35    3) contactar la superficie sobre la que se ha inmovilizado la partícula codificada, o la microesfera codificada, en un medio que comprende un material biológico;
  - 4) localizar la partícula codificada, o microesfera codificada, unida al material biológico.
21. Método para la detección de material biológico según la reivindicación 20, donde la localización según los pasos 2) y/o 4) consiste en detectar la partícula codificada o la microesfera codificada mediante al menos una técnica de detección escogida del grupo: espectroscopia de absorción y/o espectroscopia de absorción-reflectancia infrarroja aumentada en superficies y/o espectroscopia de emisión de luz fluorescente y/o emisión de luz fosforescente y/o dispersión Raman, y/o espectroscopia de dispersión Raman aumentada en superficies, y/o espectroscopia de dispersión Rayleigh.
- 45    22. Método para detección según la reivindicación 20 o 21, donde el método se lleva a cabo en una celda microfluídica o una celda de citometría de flujo.
23. Uso de la partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la detección espectroscópica o microscópica de la presencia de microorganismos, preferentemente bacterias o virus.
- 50    24. Uso de la partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la detección espectroscópica o microscópica de agentes patógenos o células inmunogénicas, o anticuerpos.
25. Uso de la partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la detección espectroscópica o microscópica de hormonas, o lípidos, o liposacáridos, o sacáridos.
- 55    26. Uso de la partícula codificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la detección espectroscópica o microscópica de reacciones químicas sobre un locus genómico determinado.
- 60    27. Uso de la microesfera codificada según la reivindicación 19, para la detección espectroscópica o microscópica de la presencia de microorganismos, preferentemente bacterias o virus.

28. Uso de la microesfera codificada según la reivindicación 19, para la detección espectroscópica o microscópica de agentes patógenos o células inmunogénicas o anticuerpos.

5 29. Uso de la microesfera codificada según la reivindicación 19, para la detección espectroscópica o microscópica de hormonas, o lípidos, o liposacáridos, o sacáridos.

30. Uso de la microesfera codificada según la reivindicación 19, para la detección espectroscópica o microscópica de reacciones químicas sobre un locus genómico determinado.

Figura 1.

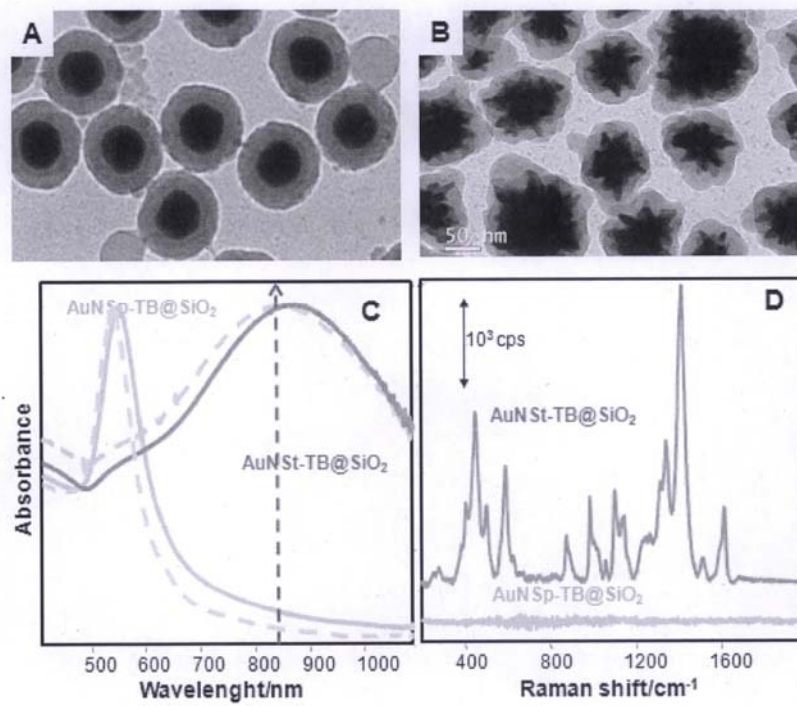


Figura 2.

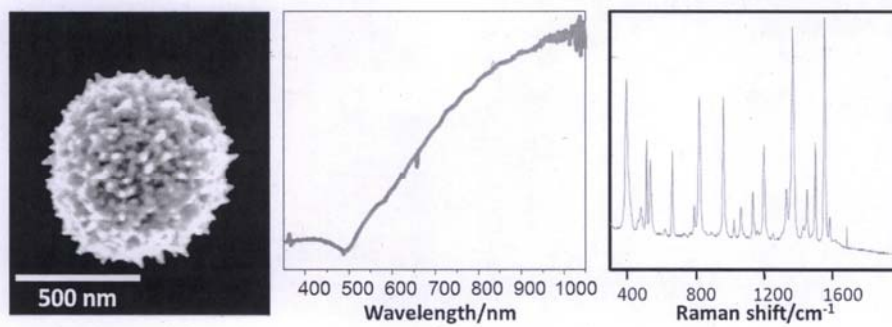


Figura 3

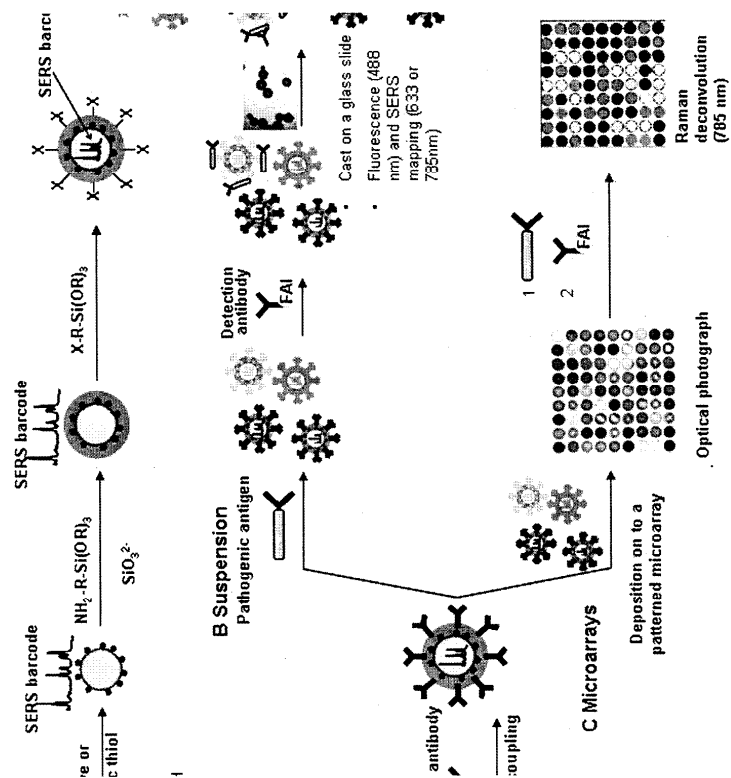


Figura 4.

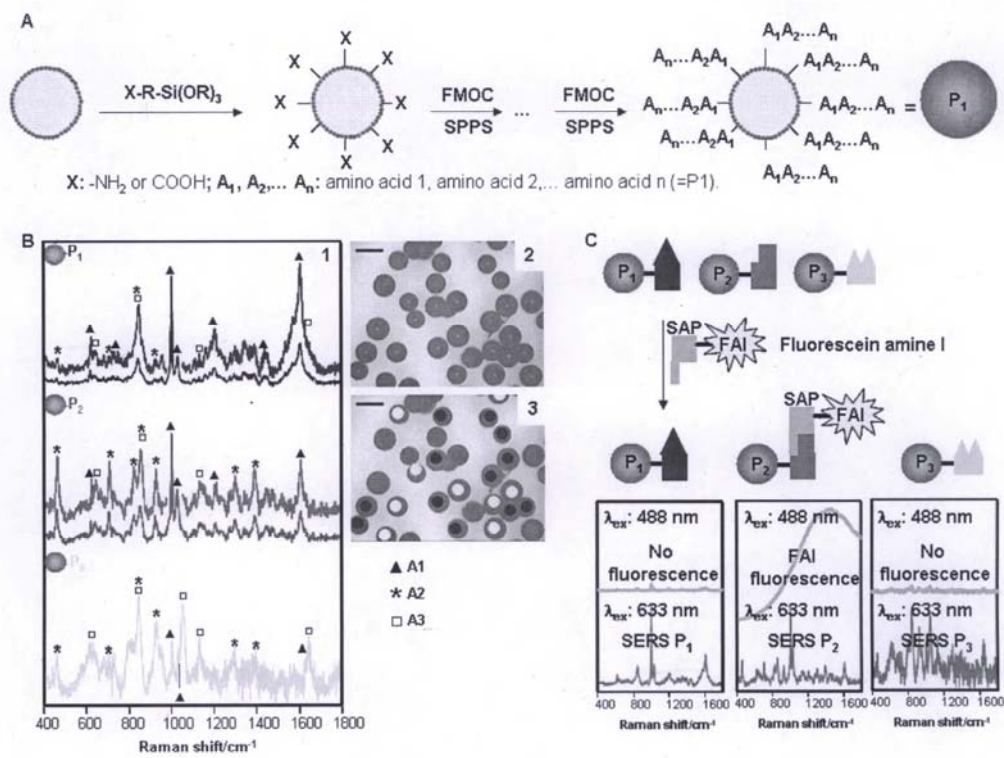


Figura 5.

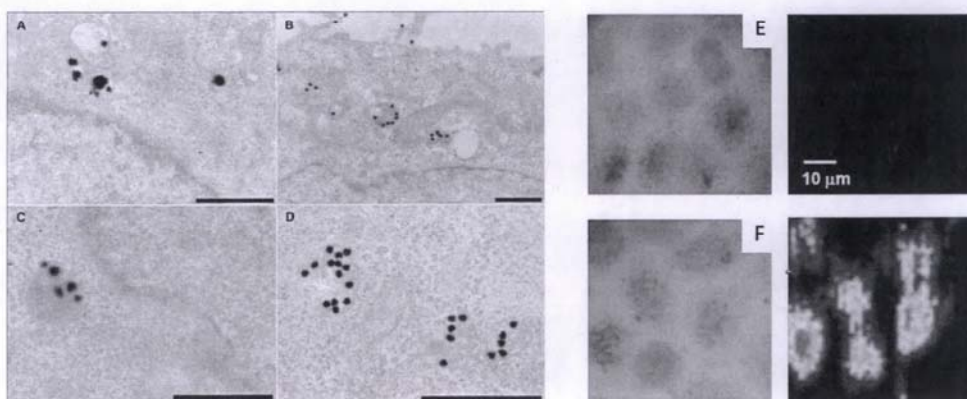
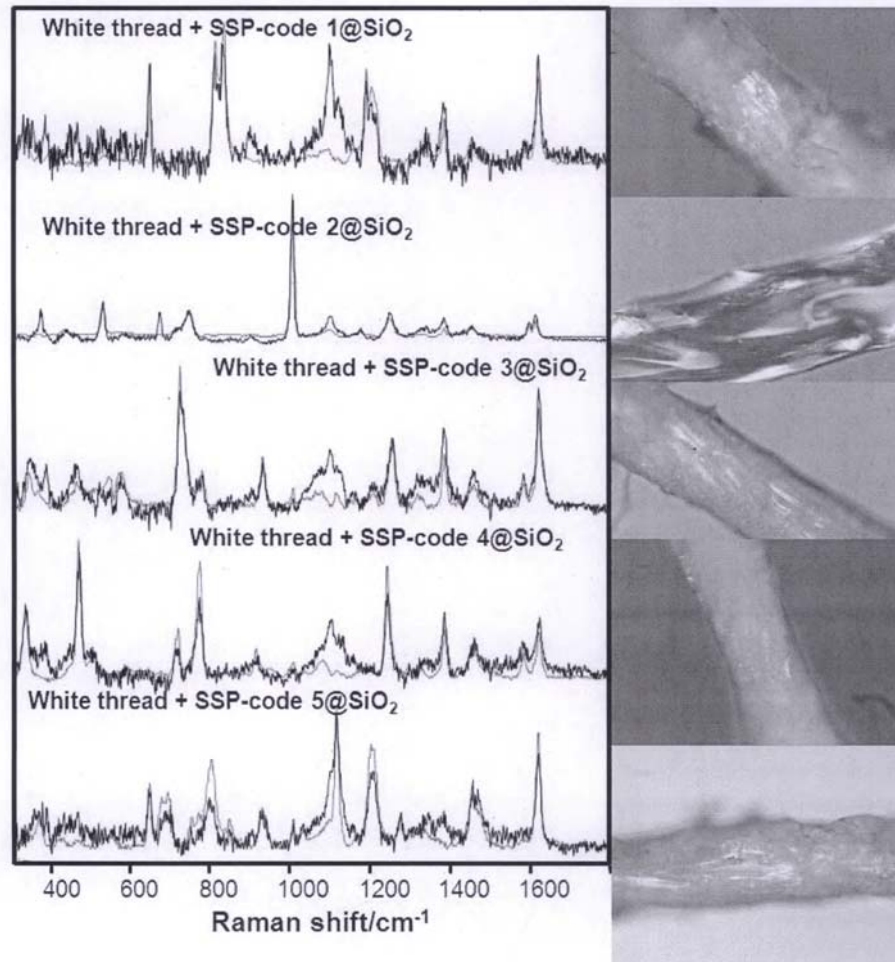


Figura 6.





- ②① N.º solicitud: 201350007  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2011  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/58** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ABALDE-CELA S et al. "Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles" Journal of the Royal Society Interface 6 Agosto 2010 Royal Society UK 06.08.2010 VOL: 7 Págs: S435-S450 ISSN 1742-5689 (print) Doi: doi:10.1098/rsif.2010.0125.focus; todo el documento.	1-17,20-26
X	KIM JONG-HO et al. "Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting" Analytical Chemistry, 20060823 American Chemical Society, US 23.08.2006 VOL: 78 No: 19 Págs: 6967-6973 ISSN 0003-2700 Doi: doi:10.1021/ac0607663; figura 1.	18-22,27-30
X	YU KYEONG N Y et al. "Multiplex targeting, tracking, and imaging of apoptosis by fluorescent surface enhanced raman spectroscopic dots" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, 20070906 ACS, WASHINGTON, DC, US 06.09.2007 VOL: 18 No: 4 Págs: 1155-1162 ISSN 1043-1802 Doi: doi:10.1021/bc070011i; todo el documento.	18-22,27-30
A	CHRISTINA I BRADY et al. "Self-Assembly Approach to Multiplexed Surface-Enhanced Raman Spectral-Encoder Beads" Analytical Chemistry, 20090901 American Chemical Society 01.09.2009 VOL: 81 No: 17 Págs: 7181-7188 ISSN 0003-2700 Doi: doi:10.1021/ac900619h; todo el documento.	18-22,27-30
A	ANDRÉS GUERRERO-MARTÍNEZ et al. "Nanostars shine bright for you" Current Opinion in Colloid & Interface Science, 20110401 Elsevier 01.04.2011 VOL: 16 No: 2 Págs: 118-127 ISSN 1359-0294 Doi: doi:10.1016/j.cocis.2010.12.007; todo el documento.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.03.2014

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/5



Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.03.2014

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 18  
Reivindicaciones 1-17, 19-30

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones  
Reivindicaciones 1-30

SI  
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ABALDE-CELA S et al. "Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles" Journal of the Royal Society Interface 6 Aug. 2010 Royal Society UK 06.08.2010 VOL: 7 Págs: S435-S450 ISSN 1742-5689 (print) Doi: doi:10.1098/rsif.2010.0125.focus.	06.08.2010
D02	KIM JONG-HO et al. "Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting" Analytical Chemistry, 20060823 American Chemical Society, US 23.08.2006 VOL: 78 No: 19 Págs: 6967-6973 ISSN 0003-2700 Doi: doi:10.1021/ac0607663.	23.08.2006
D03	YU KYEONG N Y et al. "Multiplex targeting, tracking, and imaging of apoptosis by fluorescent surface enhanced raman spectroscopic dots" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, 20070906 ACS, WASHINGTON, DC, US 06.09.2007 VOL: 18 No: 4 Págs: 1155-1162 ISSN 1043-1802 Doi: doi:10.1021/bc070011i.	06.09.2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-30, es una partícula codificada que comprende: a) al menos un núcleo metálico; b) un agente de marcaje unido a la superficie de dicho núcleo metálico, proporcionando un núcleo metálico marcado; c) una capa externa de un material inerte que encapsula a dicho núcleo metálico marcado; y d) al menos una biomolécula directamente o indirectamente unida a dicha capa externa (reiv. 1-16). Es también objeto de la presente invención un método para la preparación de la partícula codificada (reiv. 17) y el uso de dicha partícula (reiv. 23-25). Además, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una microesfera (reiv. 18), a la microesfera obtenida por el método (reiv. 19) y al uso de dicha microesfera (reiv. 26-30). Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para detectar materiales biológicos (reiv. 20-22).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes)**

El documento D01 divulga partículas codificadas para la detección por SERS (espectroscopía de dispersión Raman aumentada en superficie) de distintos analitos, incluida la caracterización y detección de macromoléculas biológicas. Dichas partículas comprenden una nanopartícula de metal (de oro o plata) de distintas formas, incluidas esferas o estrellas, unida a un grupo tiol aromático o a un colorante, y todo ello rodeado de una capa de sílice que se une a través de un grupo carboxílico a un anticuerpo de captura (ver apartados "2. Dependence of SERS intensity on composition, size and shape" al "5. SERS-encoding nanoparticles"). Este documento también divulga un método para la obtención de la partícula y un método para la detección de material biológico utilizando dicha partícula (ver apartado "5.SERS-encoding nanoparticles" y figura 7).

Los documentos D02 y D03 divulga un método para la obtención de microesferas para la detección por SERS de marcadores celulares de cáncer en células vivas (documento D02: ver fig. 1) y apoptosis (documento D03: ver resumen y fig. 1). Estos documentos también divulgan las microesferas obtenidas por dicho método, que comprenden nanopartículas de plata adsorbidas sobre microesferas de sílice (funcionalizadas con mercaptosilano) que llevan unidos marcadores, quedando todo el sistema encapsulado en una capa de sílice en cuya superficie lleva unida una biomolécula (un anticuerpo en ambos documentos D02 y D03, y anexina V en el documento D03).

A la vista de los documentos del estado de la técnica citados, la invención definida en las reivindicaciones 1-17 y 20-26, ya está anticipada en el documento D01. Del mismo modo, las características técnicas recogidas en las reivindicaciones 19-22 y 27-30, ya están divulgadas en los documentos D02 y D03.

Por lo tanto, a la vista de lo divulgado en los documentos D01, D02 y D03, el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-17 y 19-30 ya es conocido en el estado de la técnica y en consecuencia carece de novedad en el sentido del art. 6.1 LP.

**Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

Los documentos D02 y D03 divulgan un método para la obtención de microesferas para la detección por SERS de marcadores celulares de cáncer en células vivas (documento D02) y apoptosis (documento D03). El método comprende varias etapas, de las cuales, la primera consiste en la unión a una micropartícula de sílice una nanopartícula de plata. Posteriormente se le incorpora el agente de marcaje (marcador espectroscópico) y el mercaptosilano (MPTS) a la nanopartícula. Finalmente, el sistema formado se encapsula en una capa de sílice funcionalizada con grupos amino, por los cuales se une la biomolécula (por ejemplo, los anticuerpos).

La diferencia entre lo divulgado en los documentos D02 y D03, y las características técnicas recogidas en la reivindicación 18, es que la incorporación del agente de marcaje se realiza antes de la unión de la micropartícula de sílice a la nanopartícula de plata. Como no se aprecia ningún efecto técnico asociado al cambio en el orden de dichas etapas, se considera que se trata de una mera modificación arbitraria con respecto a lo conocido en el estado de la técnica que no implica actividad inventiva.

Por lo tanto, a la vista de lo divulgado en los documentos D02 y D03, el objeto de la invención tal y como se recoge en la reivindicación 18, aunque se considera nueva en el sentido del art. 6.1 LP, carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 LP.